

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 375**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/074** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2007 PCT/US2007/069645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2017 WO07140243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2007 E 07797729 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2029725**

54 Título: **Precusores de células estrelladas hepáticas y métodos para aislarlos**

30 Prioridad:

**26.05.2006 US 808548 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.04.2018**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT  
CHAPEL HILL (100.0%)  
Office of Commercialization and Economic,  
Development, 109 Church Street  
Chapel Hill, NC 27516 , US**

72 Inventor/es:

**KUBOTA, HIROSHI y  
REID, LOLA, M.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 664 375 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Precusores de células estrelladas hepáticas y métodos para aislarlos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de patente de los Estados Unidos núm. 60/808,548, presentada el 26 de mayo de 2006, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

10 Campo de la invención

La presente invención se relaciona generalmente con un método para obtener una población de células enriquecidas en progenitores de células estrelladas hepáticas.

15 Antecedentes de la invención

20 Las células estrelladas hepáticas (HpStC) se describieron por primera vez por Kupffer en el siglo 19 y se designaron como "Sternellen" por su brillo "estelar" cuando se observan bajo un microscopio. Las HpStC son células mesenquimales específicas del hígado que se encuentran en el Espacio de Disse y están compuestas, en gran parte, de gotas de lípidos citoplasmáticos que contienen vitamina A. De hecho, las gotas de lípidos contribuyen a la cualidad de "brillo" asociada con las HpStC.

25 Ahora se acepta que las HpStC desempeñan un papel importante en la absorción, almacenamiento y liberación de compuestos de vitamina A, que son necesarios particularmente para la visión, la reproducción, y el desarrollo embrionario. En los mamíferos, aproximadamente del 50 al 80 % de la vitamina A corporal total se almacena normalmente en las HpStC.

30 Las HpStC también desempeñan un papel central en la producción de factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular (ECM), y metaloproteinasas de la matriz en el hígado. Varios informes demuestran que las HpStC secretan varios mitógenos para los hepatocitos tales como EGF, TGF $\alpha$  y HGF y desempeñan un papel central en el desarrollo y la regeneración del hígado. Similarmente, varios estudios demuestran que un desequilibrio en la regulación de la ECM es un factor en la fibrosis o cirrosis hepática. Además, las propiedades contráctiles de las HpStC sugieren que estas tienen una función similar a los pericitos, que controlan el flujo sanguíneo local en los vasos sanguíneos. En conjunto, estas diversas funciones de las HpStC ilustran su papel significativo en la función hepática saludable y disfuncional.

40 A pesar de nuestra creciente comprensión de la importancia de las HpStC, el origen de las HpStC aún se desconoce. En el desarrollo temprano del hígado, las células endodérmicas en el intestino anterior dan lugar al divertículo hepático, que a su vez, se desarrolla en el mesodermo circundante llamado tabique transversal y forma los cordones hepáticos. Aunque algunos han supuesto que los progenitores de HpStC podrían derivarse de las células mesenquimales en el tabique transversal, no se han aislado HpStC a partir de este, y los marcadores de superficie que permiten la inmunoselección y/o la caracterización de las HpStC precursoras aún no se han identificado.

45 Suskind y otros (J. of Hepatology, 2004 (4): 261 - 268) enseñan que las células CD34+CK7/8+ parecen ser células estrelladas hepáticas y no células madre comunes tanto para los sistemas hematopoyético como hepático.

50 En consecuencia, existe una necesidad de marcadores que identifiquen específicamente los precusores para las HpStC y de un método para aislarlos con dichos marcadores. Además, existe una necesidad de un método para propagar las células precursoras de HpStC *in vitro*.

Resumen de la invención

55 En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para obtener una población de células enriquecidas en células progenitoras de células estrelladas hepáticas que comprende (a) proporcionar una suspensión de células individuales de células de tejido de mamífero; y secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea, (b) eliminar de la suspensión de células individuales las células que expresan el antígeno MHC de clase Ia; y (c) aislar de la suspensión celular las células que son positivas para la fluorescencia de Vitamina A, para obtener una población de células enriquecidas en progenitores de células estrelladas hepáticas. El tejido de mamífero puede ser hígado. El método puede comprender además aislar de la suspensión celular las células que son positivas para VCAM y/o integrina  $\beta$ 3; eliminar de la suspensión celular las células que expresan CD45; y/o aislar de la suspensión celular las células que expresan desmina, nestina, vimentina, actina alfa de músculo liso o una de sus combinaciones.

En algunas modalidades, las etapas de aislamiento y eliminación se llevan a cabo en un citómetro de flujo. La eliminación de células que expresan antígenos MHC de clase I puede llevarse a cabo con un anticuerpo específico de especie contra las células que expresan esos antígenos; por ejemplo, con el uso de anticuerpos contra RT1A en células hepáticas de rata. Además, las células progenitoras estrelladas hepáticas pueden ser progenitores de células estrelladas hepáticas humanas.

Aun en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para obtener una población de células enriquecidas en progenitores de células estrelladas hepáticas aisladas que comprende (a) obtener una suspensión celular de células hepáticas; y (b) secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea, (i) aislar de la suspensión de células individuales de las células hepáticas las células que son positivas para el antígeno ICAM-1 (ii) eliminar las células que son positivas para el antígeno MHC de clase I, y (iii) aislar las células que son positivas para la fluorescencia de Vitamina A según se mide en un citómetro de flujo, para obtener una población de células enriquecidas en progenitores. El método puede comprender además eliminar de la suspensión celular las células que expresan el antígeno MHC de clase I, CD45 o ambos y/o aislar de la suspensión celular las células que expresan desmina, nestina, vimentina, actina alfa de músculo liso o una de sus combinaciones.

Aun en otra modalidad de la presente descripción, se proporciona una célula precursora estrellada hepática aislada que expresa tanto el antígeno VCAM como el antígeno integrina  $\beta 3$ . Todavía en otra modalidad de la presente invención, se proporciona un método de expansión clonogénica de células precursoras estrelladas que comprende cultivar células precursoras estrelladas aisladas que expresan tanto el antígeno VCAM como el antígeno integrina  $\beta 3$  en medios libres de suero. Los medios pueden comprender además un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, insulina, transferrina, factor inhibidor de la leucemia (LIF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF) o una de sus combinaciones. Las células precursoras estrelladas aisladas pueden cultivarse además en presencia de células alimentadoras, por ejemplo, células STO.

En este sentido, antes de explicar en detalle al menos una de las modalidades de la invención, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y a los arreglos establecidos de los componentes que se exponen en la siguiente descripción o se ilustran en los dibujos. La invención es capaz de modalidades además de aquellas descritas y de realizarse o llevarse a la práctica de varias formas. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente descripción, así como en el resumen, son con el propósito de descripción y no deben considerarse limitantes.

Como tal, los expertos en la técnica apreciarán que la concepción sobre la que se basa esta descripción puede utilizarse fácilmente como una base para el diseño de otras estructuras, métodos y sistemas para llevar a cabo los diversos propósitos de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el análisis citométrico de flujo de células autofluorescentes en hígado y pulmón fetales de rata 13 dpc. (A) El patrón de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) de la población completa (ALL). Basado en el valor de SSC, se crearon los portales R1 y R2 y representan la SSC alta ( $SSC^{hi}$ ) y baja ( $SSC^{lo}$ ), respectivamente. Se muestran además los patrones de expresión de RT1A e ICAM-1 en R1 y R2. Las células  $RT1A^{-}ICAM-1^{+}SSC^{hi}$  (R2, abajo a la derecha) son hepatoblastos en el hígado fetal de rata (Kubota y Reid, 2000). El número indica el porcentaje de cada cuadrante. (B) El patrón autofluorescente de la población completa (ALL), R1, y R2 se analizó con láser UV y láser de 488 nm. Se detectó señal autofluorescente específica al láser UV con un filtro de 450 nm, mientras que la señal autofluorescente no específica excitada con un láser de 488 nm se midió con un filtro de paso de banda de 530/30. Se detectaron células autofluorescentes específicas al láser UV en R1 y R2 (arriba a la izquierda). (C) Se estudió la expresión de RT1A y la señal autofluorescente específica al láser UV. Las células autofluorescentes específicas al láser UV eran células  $RT1A^{-}$ . Se identificaron células  $ns-autoflu^{+}RT1A^{-}$  (permitir) y corresponden a la población de hepatoblastos de rata. (D) La señal autofluorescente específica al láser UV se analizó en células de pulmón fetal 13 dpc. No existen células autofluorescentes específicas al UV en la población de células de pulmón. La mayoría de las células son  $RT1A^{-}$ , y no se detectaron células autofluorescentes no específicas (comparables con la población de hepatoblastos en el hígado fetal).

La Figura 2 muestra la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en células  $vA^{+}$ . (A) Histograma de citometría de flujo para la expresión de VCAM-1 en hígado fetal 13 dpc. Aproximadamente 15 % de las células expresan VCAM-1 en la superficie celular. Los histogramas cerrados y abiertos representan células teñidas y células no teñidas, respectivamente. Las células  $VCAM-1^{+}$  y  $VCAM-1^{-}$  se analizaron mediante citometría de flujo para detectar sus señales autofluorescentes. Todas las células  $vA^{+}$  y las células  $ns-autoflu^{+}$  son VCAM-1 positivas. Los números representan el porcentaje de cada cuadrante. (B) Análisis de dos colores de células hepáticas fetales 13 dpc para RT1A e ICAM-1. La población de células R1 ( $RT1A^{-}ICAM-1^{+}$ ) contiene todas las células  $vA^{+}$  y células  $ns-autoflu^{+}$ . Estos resultados indican que las células  $vA^{+}$  y  $ns-autoflu^{+}$  son  $VCAM-1^{+}RT1A^{-}ICAM-1^{+}$ .

La Figura 3 muestra los perfiles antigénicos de las células  $vA^+$ , ns-autoflu $^+$ , y autoflu $^-RT1A^-$  en hígado fetal 13 dpc. (A) Análisis citométrico de flujo para la autofluorescencia al UV y la expresión de RT1A. En la población de células RT1A $^-$ , se crearon cuatro portales (R1-R4) basados en las señales autofluorescentes. (B) Análisis de dos colores de la expresión de VCAM-1 frente a integrina  $\beta 3$ , PECAM-1, o Thy-1 para cada población de células separadas (R1-R4). Los números representan el porcentaje de cada cuadrante. Principalmente las células R1 son VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$ , mientras que las células R3 expresan uniformemente VCAM-1, pero ninguna de integrina  $\beta 3$ , PECAM-1, o Thy-1.

La Figura 4 muestra la inmunocitoquímica de una colonia de hepatoblastos bipotentes. Las células ns-autoflu $^+$  VCAM-1 $^+$  se aislaron mediante FACS y se colocaron sobre células alimentadoras STO en HDM a una densidad celular clonal (250 células en un pocillo de placa de 12 pocillos, 66 células/cm $^2$ ). Después de 15 días en cultivo, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos contra ALB (rojo) y CK19 (verde). Cada colonia se generó a partir de una célula clasificada individual (Kubota y Reid, 2000). Más de 95 % (95,7  $\pm$  0,4 %; media  $\pm$  SEM, n = 3) de las colonias hepáticas contenían células ALB $^+$ CK19 $^+$  y células ALB $^-$ CK19 $^+$ , que representan la diferenciación hepatocítica y biliar, respectivamente.

La Figura 5 proporciona el análisis por RT-PCR de células hepáticas fetales 14 dpc fraccionadas mediante FACS. Carril 1, ns-autoflu $^+$  RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^-$ ; carril 2,  $vA^+$  RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$ ; carril 3, autoflu $^-RT1A^-$  VCAM-1 $^+$ ; carril 4, autoflu $^-RT1A^-$ VCAM-1 $^-$ ; carril 5, población restante de células VCAM-1 $^-$ ; carril 6, sin ADNc. Las células  $vA^+$  RT1A $^-$ VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  expresan fuertemente SDF-1 $\alpha$  y HGF. Las células  $vA^+$  son positivas para los marcadores de HpStC (desmina, nestina, vimentina, SMA) y negativas para los marcadores de hepatoblastos (albúmina y Prox1).

La Figura 6 muestra el efecto de LIF y EGF sobre la proliferación *in vitro* de células  $vA^+$  RT1A $^-$ VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$ . (A) Quinientas células  $vA^+$ RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  aisladas mediante FACS se colocaron en un pocillo de placa de 96 pocillos con HDM más laminina suplementado con LIF y/o EGF a la concentración indicada. Después de 5 días de cultivo, se midió el grado de proliferación celular mediante la sal de tetrazolio WST-1. El LIF apoya la proliferación de las células  $vA^+$  a tan solo 0,1 ng/ml. El EGF mejoró ligeramente la proliferación de células  $vA^+$ . (B) Doscientos cincuenta células RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  p3-integrina $^+vA^+$  aisladas mediante FACS se sembraron sobre células alimentadoras STO en HDM con EGF y/o LIF. Se usaron placas de doce pocillos. Los cultivos se tiñeron con Diff-Quick $^{\text{TM}}$  después de un período de cultivo de 2 semanas. Aunque las células STO expresan LIF, la cantidad de la producción no era adecuada para apoyar la expansión clonal de las células en ausencia de suplementación con LIF exógeno. El LIF exógeno y la adición de EGF mejoraron dramáticamente la expansión clonal de las células  $vA^+$ .

La Figura 7 muestra la inmunocitoquímica de colonias derivadas de células  $vA^+$ RT1A $^-$ VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  aisladas mediante FACS. Las células se colocaron sobre alimentadoras STO en HDM suplementado con EGF y LIF. Quince días después del cultivo *in vitro*, los cultivos se tiñeron con anticuerpos para desmina o nestina. Las células formadoras de colonias expresan nestina y desmina, mientras que las células STO no expresan ninguna de ellas.

La Figura 8 muestra la inmunocitoquímica de células  $vA^+$ RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  cultivadas durante 2 meses aisladas mediante FACS. Las células clasificadas se colocaron sobre alimentadoras STO en HDM suplementado con EGF y LIF. Las células proliferativas se subcultivaron 5 veces sobre alimentadoras STO frescas. Las células cultivadas se tiñeron con anticuerpos para desmina o nestina. Las células proliferativas mantienen la expresión de nestina y desmina durante el período de cultivo.

La Figura 9 proporciona las características fenotípicas de las células  $vA^+$  RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  cultivadas durante 2 meses. (A) Análisis por RT-PCR de células  $vA^+$ RT1A $^-$  VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  cultivadas. Las células se aislaron mediante FACS y se cultivaron sobre alimentadoras STO en HDM con EGF y LIF. Después de 2 meses de cultivo las células se fraccionaron mediante FACS. Las células proliferativas de rata y las células alimentadoras STO de ratón se fraccionaron mediante FACS después de la tinción con anticuerpo del anticuerpo monoclonal contra CD98 de ratón. CD98 se expresa en células STO de ratón, y el anticuerpo monoclonal reacciona específicamente con CD98 de ratón, pero no con CD98 de rata. Se aislaron los ARN de células de rata derivadas de  $vA^+$  y células STO. Se usaron además HpStC de rata normales y su ARN se aisló para un control. Los ADNc se sintetizaron a partir de esos ARN y se sometieron a PCR con iniciadores específicos para varios transcritos que se expresaron en las HpStC. (B) Citometría de flujo para células  $vA^+$  RT1A $^-$ VCAM-1 $^+$  integrina  $\beta 3^+$  cultivadas. Las células usadas para RT-PCR se tiñeron con el anticuerpo contra VCAM-1 o RT1A y el anticuerpo contra CD98 de ratón. La fracción negativa para CD98 se analizó para detectar la expresión de VCAM-1 o RT1A. Las células en proliferación continua derivadas de células  $vA^+$  en hígados fetales de rata expresan VCAM-1 y RT1A uniformemente bajo las condiciones de cultivo examinadas.

#### Descripción detallada de la invención

Las HpStC han recibido varios nombres, que incluyen "lipocitos", "células que almacenan grasa", "células de Ito", "células perisinusoidales," y "pericitos hepáticos." En aras de la claridad, sin embargo, solo se usará el término

HpStC en este documento, el cual, no obstante, debe entenderse que se refiere a la misma población de células que tienen cualquiera y todos los nombres alternativos mencionados anteriormente. Además, las enseñanzas en la presente descripción no se limitan a ninguna especie. De hecho, debe entenderse que los ejemplos proporcionados en la presente descripción son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes. La presente descripción, de esta manera, no está limitada por el mamífero del cual se deriva el tejido hepático. Los mamíferos de los que pueden derivarse las HpStC y sus precursores incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, roedores (*por ejemplo*, ratas, ratones, hámsters), conejos, bovinos, caballos, cerdos, y ovejas. Preferentemente, las HpStC y sus precursores se derivan de seres humanos. La presente invención tampoco se limita a ninguna etapa particular del desarrollo del hígado. Así, la presente invención puede practicarse con tejido hepático fetal, neonatal, pediátrico y/o adulto, que incluye tejido hepático de individuos recientemente fallecidos (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 30 horas post mortem).

La presente invención proporciona técnicas para el aislamiento y la propagación de las células precursoras de HpStC (también denominadas en la presente descripción "precursores de HpStC" o "HpStC precursoras"). Se identificaron precursores de HpStC en hígado fetal de rata mediante citometría de flujo con el uso de la autofluorescencia específica generada por las gotas de lípidos ricas en vA citoplasmática. El fenotipo de superficie de las células vA<sup>+</sup> pareció ser uniforme, y estas eran RT1A<sup>-</sup> ICAM-1<sup>+</sup>VCAM-1<sup>+</sup> integrina β3<sup>+</sup> PECAM-1<sup>-</sup>. Además de esos marcadores de superficie, las células vA<sup>+</sup> expresan filamentos intermedios específicos para las HpStC que incluyen desmina, vimentina, SMA, y nestina.

Aunque la expresión de ICAM-1 en las células hepáticas fetales es amplia, la integrina β3 es relativamente específica en las células vA<sup>+</sup>. La integrina β3 requiere integrina α, integrina αv o integrina αIIb, para la expresión en la superficie. La elección varía con los tipos de células. En el caso de las HpStC en hígado adulto, se usa integrina αv para la cadena α. Por lo tanto, es probable que los precursores de HpStC expresen integrina αv. Curiosamente, la interacción de integrina αvβ3 expresada en las HpStC adultas y los ligandos de ECM parece influir en la determinación del destino de las HpStC, la proliferación o la apoptosis. La integrina αvβ3 transdujo una señal estimulante para proteger las respuestas apoptóticas en las HpStC adultas. Además, otro informe mostró que la integrina αvβ3 se une a PECAM-1. Así, sin limitarse a la teoría, la expresión de la integrina β3 en los precursores de HpStC parece ser importante para recibir señales estimulantes de ligandos de ECM circundantes o células endoteliales, que expresan PECAM-1, para la proliferación durante el desarrollo del hígado fetal.

Si bien el análisis FACS indicó que se detectó una alta expresión de VCAM-1 en hepatoblastos y precursores de HpStC en el hígado fetal, los últimos pueden desempeñar papeles más importantes para las células hematopoyéticas, porque expresan además SDF-1α. SDF-1α es un potente quimioatrayente para las células madre hematopoyéticas, que expresan CXCR4, el receptor de SDF-1α. La quimiocina desempeña un papel central durante la migración de células madre/progenitoras hematopoyéticas a la médula ósea y se cree que regula positivamente la adhesión dependiente de VLA-4 a VCAM-1. Por lo tanto, es posible que la expresión de SDF-1α y VCAM-1 en los precursores de HpStC sea crucial para reclutar las células madre/progenitoras hematopoyéticas en el hígado fetal.

Curiosamente, VCAM-1 se expresa en los hepatoblastos. Además del fenotipo de superficie y la expresión de ARNm, el CFA *in vitro* para hepatoblastos demostró que las células VCAM-1<sup>+</sup> son hepatoblastos. Este hallazgo es inesperado porque VCAM-1 se conoce como un marcador de superficie para células mesenquimales tales como células endoteliales, células miogénicas, o HpStC. La expresión parece que se controla por el desarrollo porque los hepatocitos adultos son VCAM-1 mediante análisis FACS.

Al parecer los precursores de HpStC son importantes para el desarrollo del hígado, porque son los principales productores de HGF en el hígado fetal. El HGF es un factor de crecimiento crucial para el desarrollo hepático, y el factor es responsable además del crecimiento de las células del parénquima hepático durante la regeneración hepática. Además, se ha demostrado que las HpStC, pero no las células parenquimatosas, las células endoteliales, y las células de Kupffer, expresan HGF en el hígado adulto. Por lo tanto, nuestros datos y estudios anteriores sugieren que las HpStC son las principales productoras de HGF en el hígado desde los fetos hasta los adultos. Así, es probable que los precursores de HpStC desempeñen un papel crucial para el desarrollo hepático y hematopoyético en el hígado fetal porque las células son las principales productoras de HGF y SDF-1α.

Teniendo en cuenta las características fenotípicas y funcionales únicas de los precursores de HpStC, que incluyen la expresión de VCAM-1 y Hlx y la producción de HGF y SDF-1α, los precursores podrían consistir en un nicho de células madre para células madre hematopoyéticas o células madre hepáticas, o ambas en el hígado. Debido a que el sistema de cultivo libre de suero mantuvo los fenotipos característicos únicos de los precursores de HpStC *in vitro*, el sistema de cultivo puede usarse para desarrollar un sistema de ensayo de colonias *in vitro* para identificar los precursores de HpStC de los hígados adultos. Además, si se desarrolla un sistema de trasplante de HpStC, será factible la terapia celular con el uso de precursores de HpStC. La identificación, la expansión *ex vivo*, y el trasplante de precursores de HpStC o progenitores de HpStC en el hígado adulto, serían un recurso valioso para reemplazar las HpStC activadas en el hígado fibrogénico. Claramente, la identificación fenotípica y un sistema de cultivo *in vitro* para los precursores de HpStC descritos en este estudio demuestran una nueva dirección para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para las enfermedades hepáticas.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención, pero la invención no se limita de ningún modo a estos ejemplos específicos. Una persona experta en la técnica encontrará en estos ejemplos, sino uno, medios para implementar la presente invención. Además, aunque los presentes ejemplos se han presentado en el contexto de ratas para conveniencia experimental, los métodos y reactivos descritos en la presente descripción pueden traducirse fácilmente a la(s) aplicación(iones) humana(s) por un experto en la técnica a partir de las enseñanzas descritas más abajo.

Materiales y Métodos

## 10 Ratas

Se obtuvieron 344 ratas Fisher preñadas del Laboratorio de reproducción Charles River (Wilmington, MA). La mañana en que se observó el tapón se designó el día 0. Se usaron 344 ratas Fisher machos (200-250 g) para el aislamiento de las HpStC adultas. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo las directrices institucionales, y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Carolina del Norte aprobó todos los procedimientos experimentales de acuerdo con La Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias.

## 20 Preparación de las células

Los progenitores hepáticos adecuados para la propagación *in vitro* de acuerdo con la presente invención no se limitan a los aislados o identificados por cualquier método particular. En general, los precursores de HpStC pueden obtenerse a partir de cualquier sección extirpada de hígado. La sección extirpada de hígado puede disociarse después mediante procedimientos estándar en células disociadas individuales. Tales procedimientos incluyen la disociación enzimática y/o la disociación mecánica. La disociación enzimática puede llevarse a cabo en presencia de proteasa(s), tales como colagenasa(s), y/o nucleasa(s), tales como ADNasa. En algunos casos, también puede(n) usarse pronasa(s). Los métodos de disociación enzimática de células hepáticas se describen y practican en la técnica. A modo de ejemplo, los métodos para el aislamiento e identificación de los progenitores hepáticos se han descrito, por ejemplo, en el documento de patente USP núm. 6,069,005 y las solicitudes de patente USP núm. 09/487,318; 10/135,700; y 10/387,547. De hecho, existen varios procedimientos para la digestión y el aislamiento de suspensiones de células individuales de células hepáticas. Debe entenderse, por lo tanto, que el alcance de la presente invención no se limita a un método específico para la obtención de hígados enteros o la preparación de suspensiones de células individuales de estos.

En los presentes Ejemplos, se aislaron hígados fetales de ratas 13 - 14 dpc y se digirieron con 800 U/ml de colagenasa (Sigma) seguido de digestión adicional con solución de tripsina-EDTA (Sigma). La suspensión celular se trató con 200 U/ml de ADNasa I (Sigma) (Kubota y Reid, 2000).

## 40 Cultivo celular

En una modalidad preferida, las etapas de propagación *in vitro* implican usar un medio definido, suplementado con hormonas y libre de suero (HDM), para apoyar la propagación de células precursoras de HpStC sobre una capa de células alimentadoras. La función de las células alimentadoras es múltiple, e incluye el suministro de nutrientes, el suministro de una superficie de adhesión, y la secreción al medio de ciertos factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular necesarios para la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de las HpStC precursoras. Las células alimentadoras pueden ser de reptiles, aves, crustáceos, peces, anélidos, moluscos, nematodos, insectos, o mamíferos, preferentemente seres humanos. Con mayor preferencia, las células alimentadoras se derivan de tejido embrionario, y con mayor preferencia, de tejido hepático embrionario. Se cultivaron células hepáticas fetales sobre células alimentadoras STO y en un medio libre de suero hormonalmente definido como se describió anteriormente (Kubota y Reid, 2000).

El HDM consiste en una mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, GIBCO/BRL) al que se añadió albúmina de suero bovino 2 mg/ml (Sigma), insulina 5 µg/ml (Sigma), dexametasona  $10^{-6}$  M (Sigma), transferrina saturada con hierro 10 µg/ml (Sigma), nicotinamida  $4,4 \times 10^{-3}$  M (Sigma), 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M (Sigma), ácido graso libre 7,6 meq/l, glutamina  $2 \times 10^{-3}$  M (GIBCO/BRL),  $\text{CuSO}_4 \cdot 1 \times 10^{-6}$  M,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$   $3 \times 10^{-8}$  M y antibióticos (penicilina y estreptomycin). Los ácidos grasos libres comprendían ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, y linoléico (todos Sigma) en las proporciones milimolares respectivas de 31,0 : 2,8 : 11,6 : 13,4 : 35,6 : 5,6 para solución madre a 100 meq/l.

Las células alimentadoras STO se prepararon como se describió anteriormente (Kubota y Reid, 2000). En resumen, un subclón de células STO, STO5, se transfectó con pEF-Hlx-MC1neo. Un clon transfectado, STO5H1x, se trató con mitomicina C (Sigma) y se usó para células alimentadoras a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 12 pocillos. Para el cultivo a largo plazo de las células  $\text{vA}^+$  clasificadas, las células se cultivaron sobre células alimentadoras STO y en HDM suplementado con factor inhibidor de la leucemia humana 10 ng/ml (LIF; Boehringer

Mannheim) y factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml (EGF; Collaborative Biomedical Product). El medio se cambió cada dos días, y las células se subcultivaron con alimentadoras STO frescas cada semana.

#### Tinción inmunocitoquímica de colonias

5 Los procedimientos de tinción para las células cultivadas se describieron anteriormente (Kubota y Reid, 2000). En resumen, las placas de cultivo se fijaron en metanol con acetona (1:1) durante 2 minutos a temperatura ambiente, se enjuagaron y se bloquearon con suero de cabra al 20 % (GIBCO/BRL) a 4 °C. Para el doble etiquetado de albúmina (ALB) y citoqueratina (CK) 19, los cultivos se incubaron con anticuerpo anti-ALB de rata (ICN Biomedicals) y anticuerpo monoclonal anticitoqueratina 19 (CK19) (Amersham) seguido de anti-IgG de conejo conjugado con Texas Rojo (Vector laboratories) y anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Caltag). Para la expresión de nestina o desmina, las células se tiñeron con anticuerpo antinestina (Rat-401, Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa) o anticuerpo antidesmina (D33, Dako) seguido de anti-IgG de ratón conjugado con Alexa488 (Molecular Probes).

#### 15 Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

Las células se analizaron y se clasificaron mediante un clasificador de células FACStar Plus (BD Biosciences) equipado con láseres Dual Coherent 1-90. Para detectar la autofluorescencia específica de vA, las células se excitaron a 351 nm, y la emisión de fluorescencia se detectó con el uso del filtro 450DF20 (Omega Optical Inc, Brattleboro, VT). Los anticuerpos conjugados con fluorescencia se excitaron a 488 nm, y su emisión de fluorescencia se detectó mediante filtros estándar.

25 Los anticuerpos monoclonales usados para el análisis de las células de rata fueron anti-RTIA conjugado con FITC (B5; BD Biosciences), anti-ICAM-1 de rata conjugado con ficoeritrina (PE) (1A29; BD Biosciences), anti-VCAM-1 de rata (5F10, Babco), antiintegrina  $\alpha 6\beta 1$  de rata (mAB-5A, Serotec), anti-CD44 de rata (OX-49, BD Biosciences), anti-VCAM-1 de rata conjugado con PE (MR109; BD Biosciences), antiintegrina  $\beta 3$  de rata conjugado con PE o conjugado con biotina (2C9.G2; BD Biosciences), anti-PECAM-1 de rata conjugado con biotina (TLD-3A12; BD Biosciences), anti-Thy-1 de rata conjugado con biotina (OX-7; BD Biosciences). Para bloquear la unión no específica de los anticuerpos, las células se incubaron con suero de cabra al 20 % (GIBCO/BRL), gelatina de teleósteos al 1 % (Sigma), y solución de anticuerpo anti-CD32 (receptor de Fc $\gamma$ II) de rata (D34-485, Rat BD Fc Block™, BD Biosciences) antes de la tinción con anticuerpos en experimentos de FACS. Para teñir con anticuerpo anti-VCAM-1 no conjugado (5F10), se incubaron células hepáticas fetales con el anticuerpo anti-VCAM-1 seguido de tinción con anticuerpo monoclonal anti-IgG<sub>2a</sub> de ratón conjugado con biotina (R19-15, BD Biosciences). Se usó estreptavidina-Cy-Chrome (BD Biosciences) para detectar los anticuerpos conjugados con biotina.

40 Para los experimentos de FACS para aislar las células cultivadas a largo plazo que se derivaron de células vA<sup>+</sup> clasificadas, todas las células en el cultivo se cosecharon y se tiñeron con anti-CD98 de ratón conjugado con biotina (H202-141, BD Biosciences) seguido de estreptavidina-Cy-Chrome para separar las células cultivadas de rata y las células alimentadoras STO. Las células alimentadoras STO murinas se tiñeron brillantemente con el anticuerpo contra CD98 de ratón. Así, las células negativas para CD98 representan las células derivadas de rata y podrían distinguirse fácilmente con el uso de FACS como se mostró anteriormente (Kubota y Reid, 2000).

#### 45 Ensayo de formación de colonias (CFA) para hepatoblastos

El procedimiento de CFA para hepatoblastos se describió anteriormente (Kubota y Reid, 2000). En resumen, las células clasificadas se sembraron sobre alimentadoras STO por triplicado a 500 o 2500 células/pocillo (3,8 cm<sup>2</sup>) en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en HDM durante 14 ~ 15 días con cambios de medio cada dos días. Para examinar la actividad de diferenciación bipotencial de los hepatoblastos, se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia de ALB y CK19. Las colonias se tiñeron por Diff-Quick (Baxter) para contar el número de colonias por pocillo.

#### Ensayo de proliferación celular

55 Las células vA<sup>+</sup> aisladas mediante FACS se sembraron por triplicado a 500 células/pocillo en placas de 96 pocillos con HDM suplementado con laminina (Collaborative Biomedical Products) a la concentración final de 8  $\mu$ g/ml. EGF y LIF se añadieron a las concentraciones indicadas. Cinco días después de sembrar las células, los cultivos se enjuagaron dos veces para eliminar las células flotantes y se añadió medio fresco con la sal de tetrazolio WST-1 (Boehringer Mannheim) para medir el número de células adherentes viables (Kubota y Reid, 2000). Después de 4 horas, la absorbancia se determinó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

#### Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

Las secuencias de iniciador usadas para PCR se muestran en la Tabla 1.

65

Tabla 1

Diana	Secuencia	Número de amplificación
desmina	Sentido 5'-ATGAGCCAGGCCTACTCGTCC-3'	35
	Antisentido 5'-CAGCACTTCATGTTGTTGCTG-3'	
nestina	Sentido 5'-TGGAACAGAGATTGGAAGGCC-3'	35
	Antisentido 5'-CAGGAGTCTCAAGGGTATTAG-3'	
vimentina	Sentido 5'-TCCAACCGGAGCTATGTGACC-3'	30
	Antisentido 5'-CTCAGGTTCAAGGAAGAAAAG-3'	
SMaA	Sentido 5'-ATGTGTGAAGAGGAAGACAGC-3'	30
	Antisentido 5'-GTGGTTTCGTGGATGCCCGC-3'	
albúmina	Sentido 5'-ATGAAGTGGGTAACCTTTCTCC-3'	26
	Antisentido 5'-TGTGATGTGTTTAGGCTAAGGC-3'	
Prox-1	Sentido 5'-GGGGAAAACCAATTTCACAC-3'	33
	Antisentido 5'-CCAGGAAGGATCAACATCTTTGC-3'	
SDF-1 $\alpha$	Sentido 5'-ATGGACGCCAAGGTCGTCGC-3'	30
	Antisentido 5'-GAAAGGTCTCTGAGCACAG-3'	
HGF	Sentido 5'-TGGACAAGATTGTTATCGTGG-3'	33
	Antisentido 5'-ACGATTTGGGA TGGCACA TCC-3'	
Hlx	Sentido 5'-CCTCGGTCCAGTCTATAAACC-3'	30
	Antisentido 5'-CAGCCGTTCTGAGGGCGAAGC-3'	
integrina $\beta$ 3	Sentido 5'-GATGAAAAATTGGCTGGAGG-3'	33
	Antisentido 5'-GCAGGTGGCATTGAAGGACAG-3'	
GFAP	Sentido 5'-CTCAATGACCGCTTTGCTAGC-3'	35
	Antisentido 5'-ACCACGATGTTCTCTTGAGG-3'	
actina $\beta$	Sentido 5'-ATGGATGACGATATCGCTGCG-3'	26
	Antisentido 5'-GGGTGTAAAACGCAGCTCAGTAA-3'	

5 El procedimiento de RT-PCR para las células clasificadas mediante FACS se describió anteriormente (Kubota y  
otros, 2002). En resumen, las células se aislaron con el uso de un clasificador de células FACStar Plus, y los ARN  
totales se extrajeron mediante el estuche RNeasy (QIAGEN) y se sometieron a síntesis de ADNc. Los ADNc se  
sintetizaron a partir de los ARN totales mediante el cebado con oligo-dT y la transcriptasa inversa de AMV  
(Seikagaku America) en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l a 42 °C (Kubota y otros, 2002). La PCR se realizó en un  
10 volumen total de 50  $\mu$ l que consiste en cada iniciador a 1  $\mu$ M, cada dNTP a 200  $\mu$ M, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris  
HCl 10 mM, pH 8,3, y 1,25 U de Amplitaq polimerasa de oro (Perkins Elmer) con ADNc sintetizado. Las muestras se  
calentaron a 94 °C durante 3 min seguido de la amplificación durante 26-35 ciclos de 2 min a 94 °C, 2 min a 62 °C y  
3 min a 72 °C. El número de ciclos de la amplificación para cada gen diana se modificó e indicó en la Tabla 1.  
Después del último ciclo, se realizó una etapa de extensión final a 72 °C durante 6 min. Después, se analizó 5  $\mu$ l de  
15 cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los ADNc sintetizados a partir de los ARN  
totales de las células clasificadas se normalizaron por el número de células.

## Resultados

### Identificación de células vitamina A<sup>+</sup> en el hígado fetal

20 Una vez que se ha establecido una suspensión de células individuales, el aislamiento de los precursores de HpStC  
implica exponer las poblaciones de células hepáticas mixtas derivadas del tejido hepático a citometría de flujo y  
seleccionar las células que exhiben autofluorescencia específica generada por las gotas de lípidos ricas en vitamina  
A (vA) citoplasmática. La vitamina A produce específicamente una fluorescencia verde-azul cuando se excita con luz  
25 de láser de 330-360 nm (ultravioleta, UV). El análisis FACS es capaz de detectar la fluorescencia verde-azul



específica de vitamina A ( $vA^+$ ) en el citoplasma de las HpStC maduras, así como en las HpStC precursoras del hígado con el uso de un láser UV.

La Figura 1A muestra el patrón de autofluorescencia en las células hepáticas fetales 13 dpc. La señal autofluorescente azul-verde específica de  $vA$  se midió mediante la detección de la luz de emisión con un filtro de 450 nm por excitación de un láser UV (351 nm). Para detectar una señal autofluorescente no específica al láser UV, se utilizó un láser de 488 nm y un filtro de paso de banda de 530/30 nm. Los patrones de las señales autofluorescentes de la población completa de células hepáticas fetales así como de dos subpoblaciones (portales R1 y R2 de la Figura 1A) se muestran en la Figura 1B. En el patrón FACS de la población completa de células (Figura 1B ALL), se identificaron dos subpoblaciones distintas con características de autofluorescencia alta. Una tuvo una señal autofluorescente específica para la luz UV (Figura 1B ALL, arriba a la izquierda), que se refiere en la presente descripción como  $vA^+$ , mientras que las células que se ubican diagonalmente en el cuadrante superior derecho indican autofluorescencia no específica, porque las señales autofluorescentes se detectaron con el filtro de 530 nm y el filtro de 450 nm cuando se excitó con el láser de 488 nm y el láser UV, respectivamente. La subpoblación con características autofluorescentes no específicas (designada como ns-autoflu $^+$ ) se derivó exclusivamente del portal SSC $^{hi}$  (Figura 1A, R2 y Figura 1B, R2) mientras que las células  $vA^+$  (Figura 1B, arriba a la izquierda) se detectaron tanto en R1 como R2.

La Figura 1C muestra el patrón de la señal autofluorescente específica de  $vA$  y la expresión de MHC de clase Ia, que se detectó mediante un anticuerpo conjugado con FITC contra RT1A. El análisis FACS indicó que las células  $vA^+$  así como las células ns-autoflu $^+$  no tuvieron expresión de RT1A, porque las dos poblaciones no se desplazaron en la muestra teñida (Figura 1C, R2) en comparación con la muestra de control (Figura 1B, R2). Además, el análisis FACS también indicó que la población de hepatoblastos, células que son RT1A $^-$ ICAM-1 $^+$ SSC $^{hi}$  (Figura 1A R2, abajo a la derecha) y células RT1A $^-$ ns-autoflu $^+$  (Figura 1C R2, flecha), por este análisis FACS son una población superpuesta.

Para determinar si las señales autofluorescentes fueron específicas en el hígado fetal, las células del pulmón fetal de los fetos 13 dpc se aislaron y analizaron mediante FACS. El análisis FACS mostró que no habían células ns-autoflu $^+$  ni células  $vA^+$  en las células de pulmón (Figura 1D), lo que indica que las señales autofluorescentes en subpoblaciones particulares del hígado fetal eran características fenotípicas únicas.

Como se ha sugerido que las células progenitoras hepáticas (es decir, hepatoblastos) sean células RT1A $^-$ OX18 $^{lo}$ ICAM-1 $^+$ SSC $^{hi}$  en el hígado 13 dpc de feto de rata, estos marcadores se analizaron en las células  $vA^+$ . La Figura 1A muestra los patrones de análisis FACS de las células hepáticas fetales a 13 dpc, después de la tinción con los anticuerpos contra RT1A, MHC de clase I de rata, e ICAM-1. La Figura 1C muestra el patrón de la señal autofluorescente específica de  $vA$  y la expresión de RT1A, que se detectó mediante el anticuerpo contra RT1A conjugado con FITC. El análisis FACS indicó que las células  $vA^+$  así como las células ns-autoflu $^+$  no tenían expresión de RT1A, porque esas dos poblaciones no se desplazaban en la muestra teñida (Figura 1C, R2) en comparación con la muestra control (Figura 1B, R2). Además, el análisis FACS indicó que la población de hepatoblastos, células que son RT1A $^-$ ICAM-1 $^+$ SSC $^{hi}$ , (Figura 1A, R2, abajo a la derecha) y células RT1A $^-$ ns-autoflu $^+$  (Figura 1C, R2, flecha) era una población idéntica. Estos resultados indican que el análisis FACS fue capaz de detectar las células  $vA^+$  características en el hígado fetal de rata tan temprano como 13 dpc y que las células  $vA^+$  eran RT1A-ICAM-1 $^+$ .

Las células vitamina A $^+$  expresan VCAM-1 e integrina  $\beta 3$

Como se demostró anteriormente, la positividad de  $vA$  y la negatividad de MHC de clase Ia son marcadores suficientes para identificar y aislar las HpStC. Sin embargo, en algunas circunstancias, la selección de UV basada en luz UV puede no ser deseable, particularmente cuando la integridad molecular (por ejemplo, ADN) es preocupante. Por lo tanto, la presente descripción proporciona marcadores que pueden usarse además de o en lugar de la selección basada en UV. Los precursores de HpStC pueden identificarse además mediante la exposición de la población de células seleccionada a anticuerpos específicos para VCAM, más específicamente VCAM-1. VCAM-1 es significativo porque se ha demostrado que es un marcador de superficie único que distingue a las HpStC de los miofibroblastos en el hígado adulto. Además, la expresión de VCAM-1 parece que se controla por el desarrollo porque los hepatocitos adultos son negativos para este marcador.

La expresión de VCAM-1 se analizó en las células hepáticas fetales para investigar si las células  $vA^+$  expresan VCAM-1. Mediante el análisis FACS, pareció que aproximadamente el 15 % de las células eran VCAM-1 $^+$  en el hígado fetal 13 dpc (Figura 2A). A continuación, se determinó el patrón de autofluorescencia y la expresión de RT1A de las células VCAM-1 $^+$ . Las células VCAM-1 $^+$  contenían esencialmente todas las células  $vA^+$  así como la población de células ns-autoflu $^+$  completa (Figura 2A), lo que indica que las HpStC y hepatoblastos expresan VCAM-1. El análisis FACS de dos anticuerpos monoclonales contra VCAM-1 de rata (5F10 y MR109) mostró un patrón idéntico de expresión de VCAM-1. Además, las células VCAM-1 $^+$  de hígado fetal fueron células RT1A $^-$ ICAM-1 $^+$  porque el portal R1 en la Figura 2B incluyó la población de células VCAM-1 $^+$ . Estos resultados sugieren que las células VCAM-1 $^+$ RT1A $^-$ ICAM-1 $^+$  de hígado fetal consisten en células  $vA^+$ , hepatoblastos, y algunas células no autofluorescentes.

Se investigaron antígenos de superficie adicionales para distinguir las dos poblaciones autofluorescentes, las células  $vA^+$  y los hepatoblastos, los cuales fueron células  $VCAM-1^+RT1A^-ICAM-1^+$ . Debido a que la integrina  $\beta 3$  (CD61) se expresa en células endoteliales, células de músculo liso vascular, y HpStC adultas, se realizaron análisis FACS de dos colores de  $VCAM-1$  frente a integrina  $\beta 3$ . La mayoría de las células  $vA^+RT1A^-$  expresaron integrina  $\beta 3$  mientras que las células  $ns-autoflu^+RT1A^-$  fueron integrina  $\beta 3^-$ , aunque las células  $vA^+RT1A^-$  contenían algunas células  $VCAM-1^+integrina \beta 3^+$  (Figura 3B).

Las células  $autoflu^-RT1A^-$  contenían algunas células  $VCAM-1^+integrina \beta 3^+$ . La población principal restante (Figura 3B, R4) fue  $VCAM-1^-$  y parecía corresponder a la población de células R2 en la Figura 2B. La población de células R4 comprendió a células no adherentes cuando se cultivaron en placas de plástico, lo que sugiere que eran células hematopoyéticas. Una subpoblación (~20 %) de la fracción era integrina  $\beta 3^+$ . Se evaluó además, la expresión de PECAM-1 (CD31), que se conoce como un marcador de células endoteliales. Sin embargo, el análisis FACS indicó que la expresión de PECAM-1 en las células  $vA^+RT1A^-$  y células  $ns-autoflu^+RT1A^-$  fue despreciable (Figura 3B), mientras que las células  $PECAM-1^+$  se detectaron en las poblaciones de células  $autoflu^-RT1A^-$  y no adherentes (Figura 3B, R2 y R4). Se evaluó además, la expresión de Thy-1 (CD90), un marcador de superficie para células ovaes que aparecen en los hígados adultos después de las lesiones oncogénicas. El análisis FACS mostró que  $ns-autoflu^+RT1A^-$  son Thy-1<sup>-</sup>.

A diferencia, las células  $vA^+RT1A^-$ , las células  $autoflu^-RT1A^-$  y las células no adherentes expresan Thy-1 heterogéneamente. El análisis FACS indicó que las células  $ns-autoflu^+RT1A^-$  eran  $CD44^{lo}$  mientras que las células  $vA^+RT1A^-$  eran  $CD44^+$  (datos no mostrados). Aunque  $CD44$  (Pgp-1) parecía expresarse diferencialmente en las células  $vA^+RT1A^-$  y  $ns-autoflu^+RT1A^-$ , la expresión en la superficie celular fue débil. Juntos, estos datos sugieren que la tinción con anticuerpo contra integrina  $\beta 3$ , entre todos los anticuerpos examinados, facilita distinguir las células  $vA^+RT1A^-$  y las células  $ns-autoflu^+RT1A^-$ , cuyas poblaciones eran  $VCAM-1^+ICAM-1^+$  en los hígados fetales.

La población de células autofluorescentes no específicas  $VCAM-1^+integrina \beta 3^-$  contiene solo hepatoblastos

Las células hepáticas fetales de la rata hasta 14 dpc son homogéneas con potencial de desarrollo para diferenciarse tanto a los hepatocitos como a las células epiteliales biliares en dependencia del microambiente. Estos progenitores bipotentes se llaman hepatoblastos. Para examinar si las células  $vA^+$  tienen algún potencial para generar linajes de células hepáticas, se realizó el CFA (Kubota y Reid, 2000). Cuatro poblaciones de células se aislaron mediante FACS y se sometieron al CFA para hepatoblastos: 1) células  $ns-autoflu^+RT1A^-VCAM-1^+integrina \beta 3^-$  2)  $vA^+RT1A^-VCAM-1^+$  3)  $autoflu^-RT1A^-$  y 4) no adherentes  $VCAM-1^-$ . Se colocaron fracciones de células clasificadas sobre las alimentadoras STO5 en HDM, se cultivaron durante 15 días, y se tiñeron con anticuerpos contra la albúmina y CK19 para linajes hepáticos y biliares, respectivamente. Después, se contaron todas las colonias hepáticas.

El CFA indicó que las colonias hepáticas se generaron a partir de las células del grupo 1,  $ns-autoflu^+VCAM-1^+integrina \beta 3^-$  (Tabla 2, más abajo), lo que demuestra que los otros grupos de células clasificadas, que incluyen las células  $vA^+VCAM-1^+integrina \beta 3^+$ , no son progenitores hepáticos. Más del 95 % de las colonias hepáticas derivadas de las células clasificadas como grupo 1 contenían tanto células hepatocíticas (albúmina<sup>+</sup> CK19<sup>+</sup>) como células epiteliales biliares (albúmina<sup>-</sup> CK19<sup>+</sup>) (Figura 4). Además, la eficiencia de formación de colonias en las células  $ns-autoflu^+VCAM-1^+integrina \beta 3^-$  clasificadas fue aproximadamente del 31 %, y una línea celular progenitora hepática (rhel4321) establecida en un estudio anterior (Kubota y Reid, 2000) tuvo una eficiencia de colonias en el CFA de  $42,5 \pm 1,8$  %. En conjunto, el resultado del CFA en este experimento indicó que la población de células  $ns-autoflu^+VCAM-1^+integrina \beta 3^-$  es una población de hepatoblastos casi pura, porque los CFA en líneas celulares establecidas son presumiblemente mucho más altos que los de células recién aisladas.

La Tabla 2 proporciona la frecuencia de colonias estrelladas hepáticas de células hepáticas fetales de roedor clasificadas. Se crearon portales para el fraccionamiento de las células  $vA^+RT1A^-VCAM-1^+$ ,  $autoflu^-RT1A^-$ ,  $ns-autoflu^+RT1A^-$  y  $VCAM-1^-$  como se muestra en la Figura 3 R1, R2, R3 y R4, respectivamente.

Población de células	Número de células inoculadas	Número de colonias hepáticas	Eficiencia de colonias (%)
$vA^+RT1A^-VCAM-1^+integrina \beta 3^+$ ¶	2500 (6)	$3,3 \pm 0,9$	$0,1 \pm 0,0$
$autoflu^-RT1A^-$	2500 (6)	$5,5 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$
$ns-autoflu^+RT1A^-VCAM-1^+integrina \beta 3^-$ §	250 (6)	$77,0 \pm 6,7$	$30,8 \pm 2,7$
$VCAM-1^-$ †	2500 (3)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

¶: Las células  $VCAM-1^+integrina \beta 3^+$  a partir del R2 se clasificaron.  
 §: Las células  $VCAM-1^+integrina \beta 3^-$  a partir del R1 se clasificaron.

Población de células	Número de células inoculadas	Número de colonias hepáticas	Eficiencia de colonias (%)
†: Las células VCAM-1 <sup>-</sup> a partir del R4 se clasificaron.			

Las células clasificadas por citometría de flujo se cultivaron sobre alimentadoras STO a los números de células indicados por pocillo en una placa de 12 pocillos. El número de colonias hepáticas es el promedio por pocillo. La eficiencia de colonias se expresa como el porcentaje de células inoculadas en cultivo y que empezó a formar colonias después de 15 días de cultivo. Los valores son media  $\pm$  SEM. El número total de células clasificadas inoculadas en los pocillos está entre paréntesis.

Expresión génica de células vitamina A<sup>+</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> recién aisladas

A continuación se analizó el patrón de expresión génica de las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> para examinar si expresan varios marcadores para las HpStC. Cinco poblaciones se aislaron mediante FACS, y los ARN se aislaron de las cinco poblaciones. La RT-PCR para los marcadores de HpStC se realizó con el uso de los ADNC sintetizados a partir de los ARN. Las cinco poblaciones fueron: 1) población de células ns-autoflu<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>-</sup>, 2) vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup>, 3) autoflu<sup>-</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup>, 4) autoflu<sup>-</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>-</sup>, y 5) no adherentes VCAM-1<sup>-</sup>. Las HpStC en hígado adulto expresan filamentos intermedios, desmina y nestina, que no se expresan en otros tipos de células en el hígado.

Los análisis por RT-PCR mostraron que las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup>, ns-autoflu<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup>, y autoflu<sup>-</sup> VCAM-1<sup>-</sup> expresaron los cuatro filamentos intermedios. Las células ns-autoflu<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> expresan albúmina así como Prox1, que es un factor transcripcional que se expresa específicamente en los hepatoblastos. Este resultado fue consistente con los datos obtenidos de los ensayos CFA, que demostraron que esta población comprendía hepatoblastos. No hubo expresión de nestina, SMAa o vimentina en la población de hepatoblastos. La expresión de filamentos intermedios específicos de HpStC sugiere fuertemente que las células vA<sup>+</sup> son precursores de HpStC.

Posteriormente, se investigó la expresión de tres marcadores de células mesenquimales separados, HGF, factor-1 alfa derivado de células estromales (SDF-1a) y factor de transcripción de homeobox divergente, Hlx, con el uso de RT-PCR. HGF es necesario para el desarrollo hepático normal, especialmente para la proliferación y diferenciación de los hepatoblastos en el ratón, y en el hígado adulto las HpStC son las principales productoras de HGF. SDF-1a es una potente quimiocina para los progenitores hematopoyéticos, y las células madre hematopoyéticas en el hígado fetal migran en respuesta a la quimiocina. Hlx se expresa en células mesenquimales en el desarrollo de hígado fetal y desempeña un papel indispensable en la hematopoyesis hepática fetal y el desarrollo hepático.

Curiosamente, las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> expresaron los transcritos de HGF, SDF-1a y Hlx más fuertemente entre todas las fracciones celulares examinadas (Figura 5). Colectivamente, las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> son desmina<sup>+</sup> nestina<sup>+</sup> SMAa<sup>+</sup> vimentina<sup>+</sup> Hlx<sup>+</sup> y son las principales productoras de HGF y SDF-1a en el hígado fetal.

Expansión clonal *ex vivo* de las células RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> vA<sup>+</sup>

Las HpStC aisladas de hígado adulto tienen una actividad proliferativa limitada *in vitro*. Se investigó la capacidad de crecimiento *ex vivo* de las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> en hígados fetales, debido a que los precursores de HpStC pueden tener una amplia actividad proliferativa. LIF es un factor de crecimiento pleiotrófico para muchos tipos de células diferentes, incluidas las células madre embrionarias o las células miogénicas. Cuando las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup>, que se aislaron mediante FACS, se cultivaron con un medio libre de suero hormonalmente definido a una densidad celular de 500 células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 5 días en presencia de LIF, las células se expandieron de una manera dependiente de la dosis (Figura 6A). Además, el EGF, un factor de crecimiento para varios tipos de células, que incluyen las células madre neurales, mejoró la proliferación de los precursores de HpStC inducida por LIF, pero no apoyó la expansión en sí misma (Figura 6A).

La proliferación, sin embargo, no persistió en la condición de usar solo placas de cultivo de plástico. Por lo tanto, las células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> clasificadas mediante FACS se colocaron a continuación sobre las alimentadoras STO5 (Kubota y Reid, 2000). Aunque las células STO producen LIF, el LIF exógeno y la suplementación de EGF apoyaron dramáticamente aún más la formación de colonias de células vA<sup>+</sup> RT1A<sup>-</sup> VCAM-1<sup>+</sup> integrina  $\beta$ 3<sup>+</sup> clasificadas (Figura 6B). Las células proliferativas en el cultivo expresaron desmina y nestina, mientras que las alimentadoras STO5 no expresaron ninguna de ellas (Figura 7). Se escogieron tres colonias individuales y se colocaron sobre alimentadoras STO5 frescas. Las células derivadas de una colonia individual continuaron su proliferación en los cocultivos con las alimentadoras STO5 suplementados con LIF y EGF durante 2 meses, lo que indica que tienen un amplio potencial de crecimiento. La expresión de desmina y nestina se mantuvo en las células proliferativas (Figura 8).

Para comparar además los fenotipos característicos de las células cultivadas durante 2 meses con las células  $vA^+ RT1A^- VCAM-1^+$  integrina  $\beta 3^+$  recién aisladas, se realizó la RT-PCR. Las células derivadas de una colonia individual (A428-3) que se mantuvieron durante 2 meses en cultivo se separaron de las células alimentadoras STO5 mediante FACS, y el ARN se extrajo para el análisis por RT-PCR. Para obtener una muestra de control se aisló el ARN de las células alimentadoras STO5 que se clasificaron de manera simultánea. Además, se aisló el ARN de las HpStC adultas para compararlo con las células A428-3 y STO5.

Los resultados demostraron que las A428-3 expresaban desmina, nestina, SMaA, vimentina, integrina  $\beta 3$ , SDF-1 $\alpha$ , HGF, y Hlx, lo que indica que el patrón de expresión fue similar a las células  $vA^+ RT1A^- VCAM-1^+$  integrina  $\beta 3^+$  frescas (Figura 5 y Figura 9A). Además, la expresión de VCAM-1 se confirmó mediante el análisis FACS (Figura 9B). La expresión de RT1A pareció inducirse en el cultivo in vitro (Figura 9B). Los resultados de RT-PCR de las HpStC adultas concuerdan con informes anteriores, en los que el fenotipo de las HpStC adultas normales es desmina $^+$ , proteína ácida fibrilar glial (GFAP) $^+$ , HGF $^+$ , pero SMaA $^{low}$ . Los resultados mostraron además que las HpStC adultas expresan SDF-1 $\alpha$ , integrina  $\beta 3$ , y Hlx. No hubo expresión de GFAP en las células A428-3 (Figura 9A) ni en ninguna fracción probada en hígado fetal.

La presente descripción, sin embargo, proporciona marcadores adicionales que pueden usarse junto con los marcadores mencionados anteriormente para identificar las células precursoras de HpStC, que incluyen, por ejemplo, integrina  $\beta 3$ +PECAM-1-VLA-6+ y CD44H-. La ICAM-1 y la integrina  $\beta 3$  se expresan también en las HpStC maduras. Además de esos marcadores de superficie, tanto las HpStC precursoras como maduras expresan filamentos intermedios específicos para las HpStC que incluyen desmina, vimentina, actina alfa de músculo liso y nestina.

En este estudio, no hubo expresión detectable de GFAP en células A428-3 (Figura 9A) o en ninguna fracción probada en GFAP de hígado fetal. Además, no hubo expresión de GFAP en hígado fetal 13 dpc. Aunque GFAP es un marcador usado para identificar astrocitos en el sistema nervioso central, la proteína se expresa además, en las HpStC en el hígado adulto. Sin embargo, no se encontró ARNm de GFAP por RT-PCR en ninguna de las fracciones celulares examinadas, así como en la muestra completa de hígado fetal. Además, incluso después del cultivo de los precursores de HpStC aislados, no se indujo la expresión de GFAP, mientras que la expresión de desmina y nestina se mantuvo en el cultivo. Este resultado sugiere que los precursores de HpStC en el hígado fetal adquirirán la expresión de GFAP en una etapa de desarrollo posterior. No se puede, sin embargo, excluir otra posibilidad, en la que las células GFAP+ se derivan de precursores diferentes que no existen en el hígado fetal de 13 dpc. Las células circulantes en el flujo sanguíneo pueden ser una fuente del origen celular alternativo. Sin embargo, la mayoría de las HpStC en hígado adulto expresan GFAP; por lo tanto, es poco probable que la contribución menor de células circulantes a partir de la sangre se convierta en una población dominante en el hígado. Por lo tanto, parece más probable que la adquisición de la expresión de GFAP ocurra durante la maduración de las HpStC.

Los datos indicaron además que los precursores de HpStC tenían una expresión relativamente fuerte de la proteína homeobox divergente, Hlx. Aunque la relación entre la expresión de Hlx y el desarrollo de HpStC no es clara, la pérdida de expresión de Hlx puede contribuir a los defectos en los ratones mutantes. Los precursores de HpStC en el hígado fetal de ratón expresan además HGF, SDF-1 $\alpha$  y Hlx.

Además del fenotipo de superficie único de los precursores de HpStC, el sistema de cultivo establecido en este estudio puede usarse para identificar los precursores de HpStC en el hígado adulto. Hasta ahora, las HpStC de hígado adulto se han cultivado en medio suplementado con suero fetal bovino. Normalmente, las HpStC cultivadas en el medio suplementado con suero dan lugar a células miofibroblásticas, que adquirieron características fibroblásticas y perdieron los fenotipos HpStC originales. Por lo tanto, las condiciones del medio suplementado con suero no son apropiadas para identificar los precursores de HpStC. Las condiciones de cultivo libre de suero descritas en este estudio apoyan el mantenimiento *ex vivo* de los progenitores de HpStC.

Parece que los precursores de HpStC desempeñan papeles clave en el desarrollo del hígado, porque expresan más transcritos de HGF que cualquier subpoblación de células hepáticas fetales en las fracciones examinadas. HGF es un factor de crecimiento crucial para el desarrollo hepático (Schmidt y otros, 1995), y el factor es responsable además del crecimiento de las células del parénquima hepático durante la regeneración hepática (Michalopoulos y DeFrances, 1997). Además, se ha demostrado que las HpStC, pero no las células parenquimatosas, las células endoteliales, o las células de Kupffer, son las productoras de HGF en el hígado adulto (Schirmacher y otros, 1992). Por lo tanto, nuestros datos y los de estudios anteriores sugieren que las HpStC son las principales productoras de HGF en el hígado desde los fetos hasta los adultos.

En este estudio, no hubo expresión de GFAP en el hígado fetal 13 dpc.

Una proteína homeobox divergente, Hlx, se expresa en el tabique transversal y las células mesenquimales en el hígado fetal (Lints y otros, 1996). Un estudio anterior de ratones con supresión génica de Hlx demostró que los

ratones mutantes tienen un deterioro del desarrollo hepático y de la hematopoyesis hepática fetal (Hentsch y otros, 1996).

5 Los experimentos de trasplante indicaron que el defecto hematopoyético se causó por el microambiente del hígado fetal, pero no por los propios progenitores hematopoyéticos. Por lo tanto, las células H1x<sup>+</sup> son una población de células crucial en el hígado fetal para apoyar el desarrollo hepático y hematopoyético. Nuestros datos indicaron que los precursores de HpStC expresaron H1x con fuerza. Por lo tanto, es interesante examinar si los ratones con supresión génica a Hlx tienen precursores de HpStC. Aunque la relación entre la expresión de Hlx y el desarrollo de HpStC no es clara, la pérdida de la expresión de Hlx puede contribuir a los defectos en los ratones mutantes.

10 Recientemente, se encontró que precursores similares de HpStC en el hígado fetal de ratón expresaron también HGF, SDF-1a y H1x. Además, los presentes inventores identificaron células mesenquimales con marcadores similares (por ejemplo, actina alfa de músculo liso) en hígados fetales humanos y demostraron que eran vitales para la expansión *ex vivo* de células madre hepáticas humanas.

15 Los precursores de HpStC que se purificaron mediante FACS proliferaron sobre las alimentadoras STO y en condiciones de medios libres de suero suplementados con lípidos, insulina, transferrina, EGF y LIF. Nuestros datos indicaron que LIF es más beneficioso para la proliferación *in vitro*. Con el apoyo de las alimentadoras STO, los precursores de HpStC se replicaron continuamente durante más de 2 meses. Las células cultivadas expresaron VCAM-1, integrina  $\beta$ -3, desmina, vimentina, actina alfa de músculo liso, nestina, HGF y SDF-1a. Estos fenotipos de

20 precursores de HpStC frescos no cambiaron durante el cultivo *in vitro*.

Además del fenotipo de superficie único de los precursores de HpStC, el sistema de cultivo establecido en este estudio puede usarse para identificar los precursores de HpStC en el hígado adulto. Hasta ahora, las HpStC de hígado adulto se han cultivado en medio suplementado con suero fetal bovino. Normalmente, las HpStC cultivadas

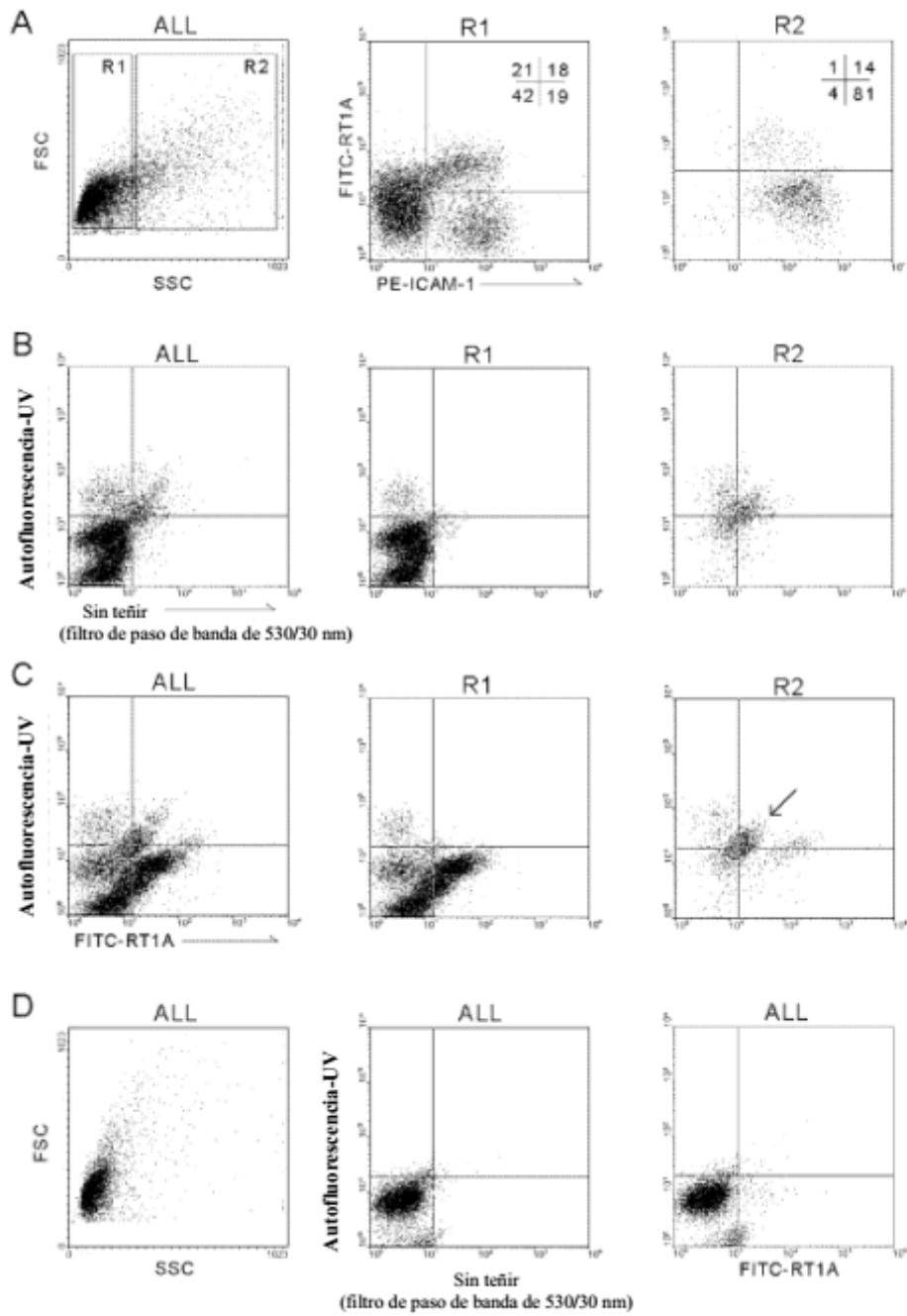
25 en el medio suplementado con suero dan lugar a células miofibroblásticas, que adquirieron características fibroblásticas y perdieron los fenotipos HpStC originales. Por lo tanto, las condiciones del medio suplementado con suero no son apropiadas para identificar los precursores de HpStC. Las condiciones de cultivo libre de suero descritas en este estudio apoyan el mantenimiento *ex vivo* de los progenitores de HpStC. Si existen precursores de HpStC en el hígado adulto, serían un recurso valioso para reemplazar las HpStC activadas en el hígado fibrogénico.

30 La identificación fenotípica y un sistema de cultivo *in vitro* para los precursores de HpStC facilitarán el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para las enfermedades hepáticas.

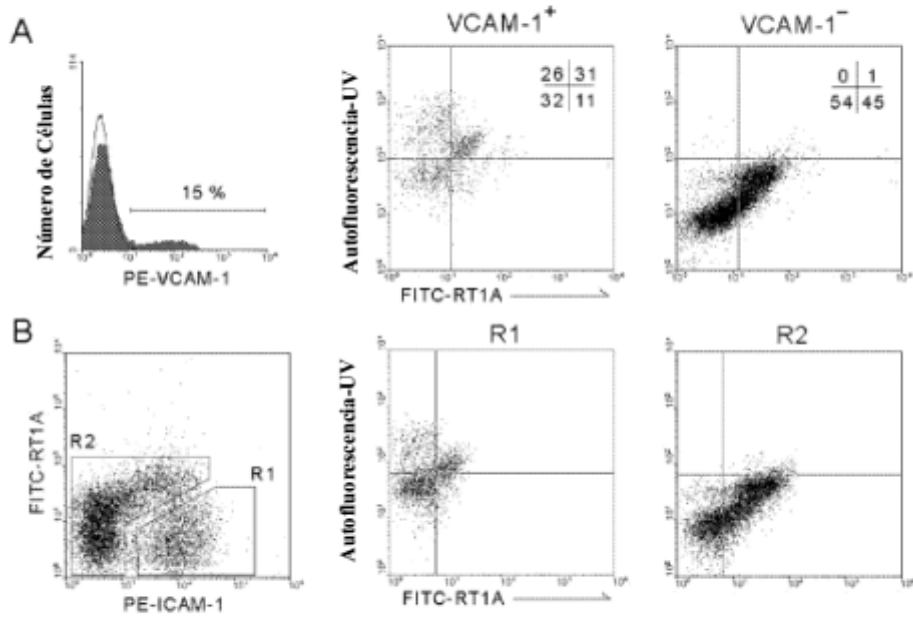
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para obtener una población de células enriquecidas en progenitores de células estrelladas hepáticas a partir de una suspensión de células individuales proporcionada a partir de hígado de mamífero, el método comprende, secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea:  
 (a) eliminar de la suspensión de células individuales las células que expresan el antígeno MHC de clase Ia; y,  
 (b) aislar de la suspensión celular las células que son positivas para la fluorescencia de Vitamina A; para obtener una población de células enriquecidas en los progenitores de células estrelladas hepáticas.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además: secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea (c) aislar las células que son positivas para VCAM.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la eliminación de las células que expresan CD45.
- 15 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además: secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea (c) aislar las células que son positivas tanto para el antígeno VCAM como para la integrina  $\beta 3$ .
- 20 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además: secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea, (d) aislar de la suspensión celular las células que expresan desmina, nestina, vimentina, actina alfa de músculo liso o una de sus combinaciones.
- 25 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea, (i) aislar de la suspensión de células individuales las células que son positivas para el antígeno ICAM.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además: secuencialmente, en cualquier orden, o esencialmente de manera simultánea, (iv) aislar de la suspensión celular las células que expresan desmina, nestina, vimentina, actina alfa de músculo liso o una de sus combinaciones.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en las cuales la eliminación de las células que expresan el antígeno MHC de clase I se lleva a cabo con un anticuerpo.
- 35 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las etapas de aislamiento y eliminación se llevan a cabo en un citómetro de flujo.
- 40 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células progenitoras estrelladas hepáticas son progenitoras de las células estrelladas hepáticas humanas.
- 45 11. Un método de expansión clonogénica de células precursoras estrelladas que comprende:  
 a) obtener una población de células enriquecidas en progenitores de células estrelladas hepáticas de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10; y,  
 b) cultivar las células precursoras estrelladas aisladas obtenidas en a), con células alimentadoras en medios libres de suero que comprenden (i) LIF y EGF e (ii) insulina, transferrina, o una de sus combinaciones.

**FIGURA 1**

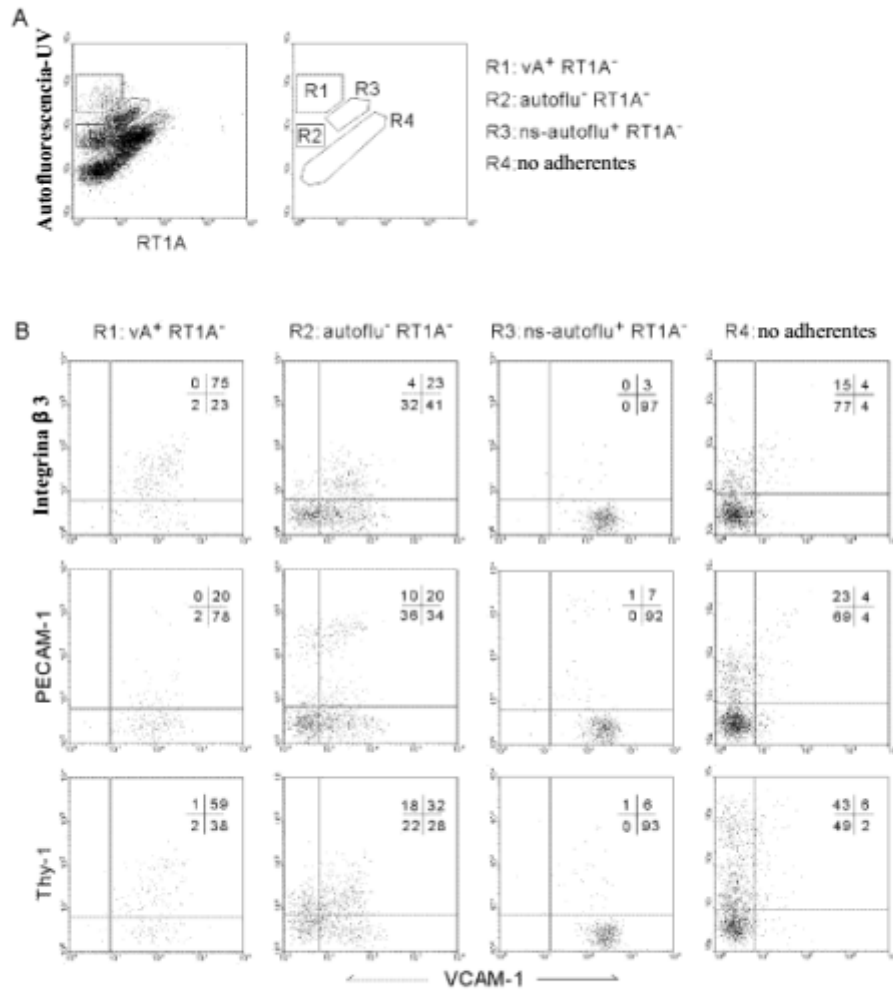


**FIGURA 2**

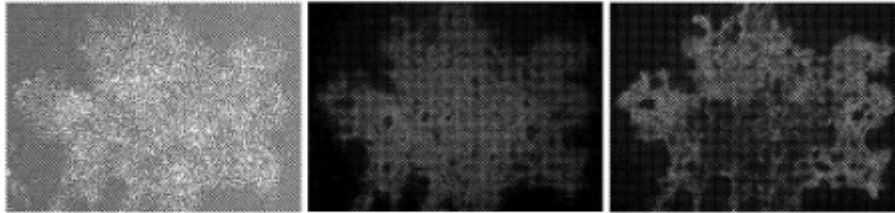




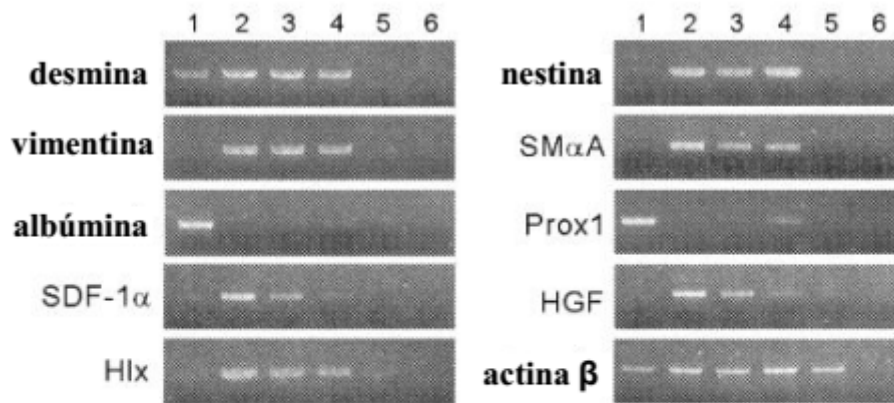
**FIGURA 3**



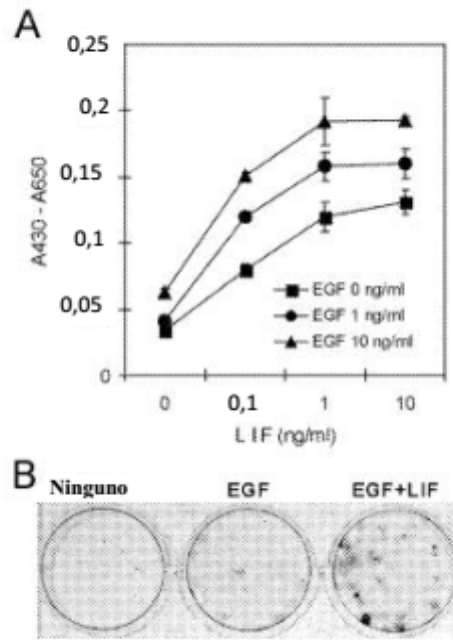
**FIGURA 4**



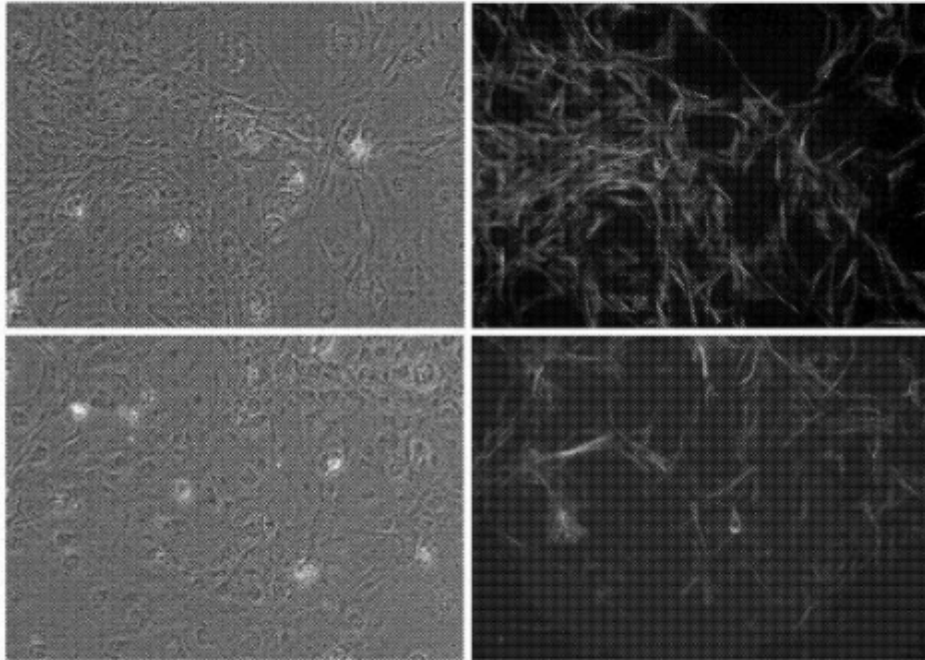
**FIGURA 5**



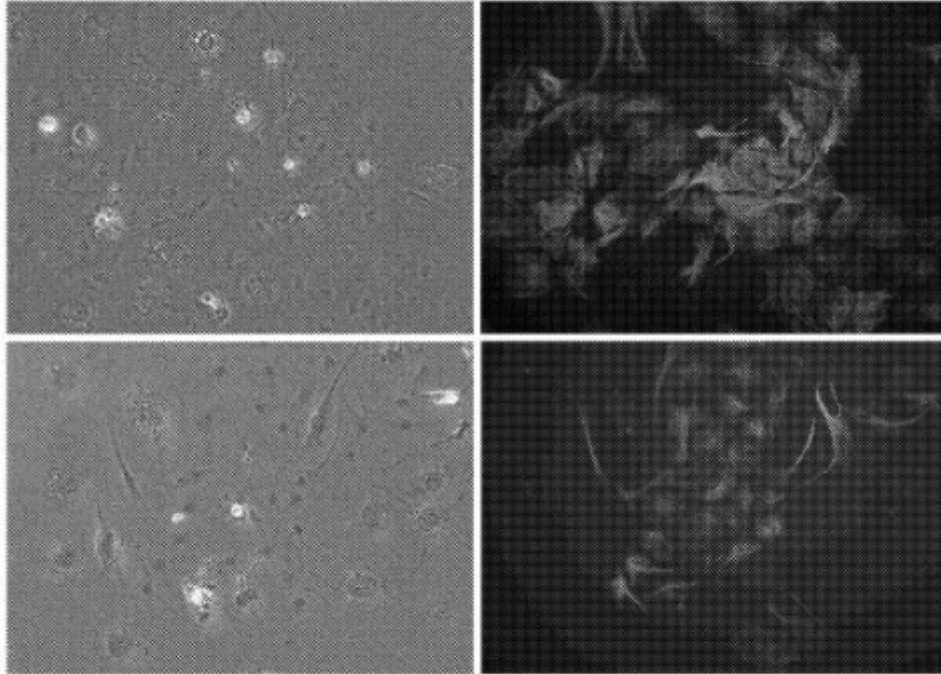
**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**



**FIGURA 9**

